

Fotos: Saulo Coelho Nunes e Adriane Leite do Amaral



Metodologia de Desidratação do Pólen de Cana-de-açúcar

Adriane Leite do Amaral¹

Tassiano Maxwell Marinho Câmara²

João Messias dos Santos³

Luiz Sérgio Costa Duarte Filho⁴

Geraldo Veríssimo de Souza Barbosa⁵

Introdução

A desidratação do pólen em cana-de-açúcar favorece a conservação e a realização de cruzamentos entre genitores assíncronos no florescimento, sendo de aplicação prática no programa de melhoramento.

O pólen da cana-de-açúcar é sensível a desidratação pela ausência de lipídios para impermeabilizar a exina, camada de células mais externas que ficam em contato com o ambiente (LIU et al., 1980). Com meia-vida de somente 12 minutos, os grãos-de-pólen sobrevivem no máximo 35 minutos em condições de ambiente com 26,5°C de temperatura e 67% de umidade relativa do ar (VENKATRAMANN, 1922; MOORE, 1976, citados por Australia (2008)). Estudos com diversas espécies vegetais, classificam os grãos-de-pólen como tolerantes ou sensíveis à desidratação, em que o pólen binucleado é mais tolerante e o pólen trinucleado é sensível (HUGHES; LEE, 1991). A cana-de-açúcar possui grãos de pólen trinucleados, muito pequenos (LIU et al., 1980) e que dessecam rapidamente após a deiscência.

Dentre as técnicas que já foram aplicadas para reduzir teores de umidade de grãos de pólen podem ser relacionados: a liofilização (MCGUIRE, 1952;

AKIHAMA et al., 1978) o uso de substâncias higroscópicas como a sílica gel (WANG, 2004; AHLGREN; AHLGREN, 1978) e solução de cloreto de sódio (FERREIRA et al., 2012), frequentemente acondicionadas em recipientes que proporcionam condição de vácuo, como os dessecadores. A sílica gel tem sido recomendada como o mais eficiente meio de desidratação de pólen de cana devido ao seu baixo custo, fácil manipulação e ambiente estável de desidratação (HAIPENG et al., 1993).

Trabalhos recentes comprovaram eficiência na conservação do pólen em cana-de-açúcar com indicação de uso da sílica como agente desidratante (AMARAL et al., 2012; AMARAL et al., 2013b). Contudo, estes trabalhos não estabeleceram a metodologia, não apresentaram estimativas do teor de água constitucional e nem estimaram o grau de dessecação tolerado pelos grãos de pólen. No geral, é raro encontrar a descrição detalhada de metodologias de desidratação e de determinação do teor de água constitucional para grãos-de-pólen. Isso tem dificultado a repetibilidade e a utilização nos programas de melhoramento genético de plantas (FRANÇA et al., 2010).

¹Engenheira-agrônoma, doutora em Melhoramento Genético de Plantas, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

²Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Rio Largo, AL

³Engenheiro-agrônomo, doutor em Biotecnologia na Agropecuária, professor da Universidade Federal de Alagoas, pesquisador da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (Ridesa-UFAL)

⁴Engenheiro-agrônomo, doutor em Química e Biotecnologia na Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, AL

⁵Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciências, professor da Universidade Federal de Alagoas, pesquisador da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (Ridesa-UFAL)

Considerando que a desidratação é um dos principais gargalos para o êxito no armazenamento de pólen de cana-de-açúcar em baixas temperaturas, o presente estudo teve por objetivo a proposição de uma metodologia de desidratação prática e de aplicação direta no melhoramento genético da cana-de-açúcar.

Metodologia

Para a desidratação do pólen de cana-de-açúcar é importante considerar as condições da coleta das inflorescências no campo, a forma de extração do pólen das flores, o tipo de amostra e de acondicionamento do pólen e as características do agente de desidratação utilizado. Todos esses fatores são recomendados em etapas na metodologia de desidratação do pólen de cana-de-açúcar visando a preservação da viabilidade polínica e futuras aplicações em programas de melhoramento de *Saccharum* spp.

Para realizar esta pesquisa a Embrapa Tabuleiros Costeiros e a Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroenergético, coordenada pela Universidade Federal de Alagoas (Ridesa-UFAL) trabalharam em parceria. Os estudos foram desenvolvidos durante o ano de 2012, no Banco Ativo de Germoplasma de Cana-de-açúcar (BAG Cana), pertencente à Ridesa-UFAL. O BAG fica localizado na Estação de Floração e Cruzamentos Serra do Ouro, na cidade de Murici, AL (09° 13' S, 35° 50' W), a uma altitude de 510 m acima do nível do mar e a 34 km de distância do Litoral.

Coleta de inflorescências

Deve-se coletar as inflorescências de cana-de-açúcar (panículas) nas primeiras horas da manhã (antes das 8 horas) e na presença de sol, evitando coletar em dias de chuva porque o excesso de umidade dificulta o processo de desidratação dos grãos de pólen. A umidade relativa do ar no momento da coleta das inflorescências pode influenciar as aferições de umidade do pólen (HAIPENG et al., 1993).

Para a coleta das inflorescências recomenda-se o corte da haste floral com tesoura, mantendo 100 cm de comprimento (Figura 1).

É importante que as anteras estejam em processo de liberação do pólen (antese) em pelo menos 1/3 da panícula (Figura 2a, 2b e 2c). As panículas coletadas podem ser embaladas em sacos de papel (duas panículas/saco) para envio ao laboratório (tempo máximo de 30 minutos). Não recomenda-

se o uso de sacos plástico porque podem reter água. As panículas podem aguardar a extração de pólen em baldes com água (tempo máximo de 30 minutos), conforme ilustrado na Figura 1.

Extração do pólen

Para a extração do pólen, recomenda-se que as panículas sejam trabalhadas manualmente com o auxílio de pincéis (cerdas macias) sobre superfície lisa (mesa de fórmica branca) conforme ilustrado nas Figuras 2d, 2e, 2f, 2g e 2h.



Figura 1. Visualização da Inflorescências de cana-de-açúcar no campo (a) no momento da coleta (b) e em baldes com água aguardando para a extração do pólen (c).

Fotos: Adriane Leite do Amaral (a; b; c; d) e Saulo Coelho Nunes (e; f; g; h)



Figura 2. Panículas apresentando antese em diferentes posições: (a) ápice, (b) centro (c) base. Detalhe das anteras (d) e da extração para formação das amostras com pólen (e,f,g,h).

Tipo e tamanho de amostra de pólen

Como existe dificuldade inerente à extração do pólen de dentro das anteras, dois tipos de amostras podem ser formadas e utilizadas na desidratação: grãos-de-pólen e grãos-de-pólen mais anteras

(Figura 3). Em geral, duas panículas fornecem amostras com pesos médios superiores a 0,1 g e 0,2 g para grão-de-pólen e grãos-de-pólen mais anteras, respectivamente.

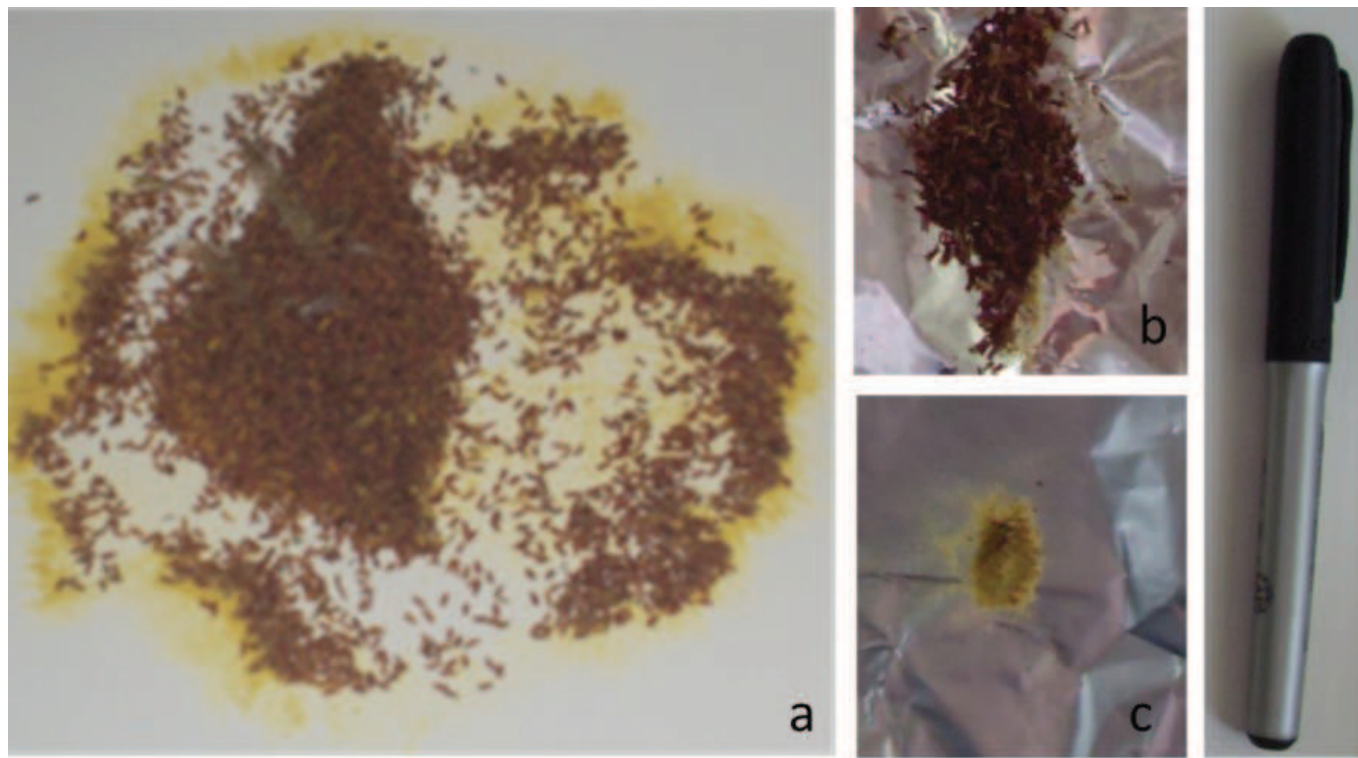


Figura 3. Volume de material extraído de duas panículas cana-de-açúcar, com formação de amostras com pólen mais anteras (a, b) e de grão-de-pólen (c), ambas utilizadas na determinação da umidade.

Desidratação com sílica

A sílica gel azul é um composto sintético de Silicato de Sódio (SiO_2) com 99,5% de sílica e 0,5% de Cloreto de Cobalto, sendo este último o indicador de cor azul. A sílica muda da cor azul para a cor rosa quando adsorve umidade. A praticidade de uso da sílica tem se difundido para secagem e desidratação de tecidos vegetais. Contudo, fornecedores de sílica gel indicam uma capacidade de adsorção máxima de umidade equivalente a 30% do peso de sílica gel utilizado em dessecadores de vidro (CARDOSO, 2015). Este tipo de informação é de pouca utilidade em pesquisa porque não pode ser extrapolado para a secagem de partes vegetais, devido as variações na resistência à perda de água, inerente às células e tecidos.

Para a desidratação de pólen de cana-de-açúcar recomenda-se o uso de sílica gel azul (formulação em grânulos com diâmetro 1 a 4 mm) dentro de dessecadores de vidro (300 mm de diâmetro), com uma quantidade de 200.000 mg de sílica gel azul, para quatro frascos tipo coletor (80 mL) contendo amostras de pólen de aproximadamente 500 mg.

Recomenda-se fechar os dessecadores com parafilme, para evitar a troca de ar com o ambiente externo e impedir interferências da umidade relativa do ar. Durante o tempo de desidratação recomendado (1 hora) as amostras em dessecadores devem ser mantidas na geladeira (4 °C) conforme mostra a Figura 4.

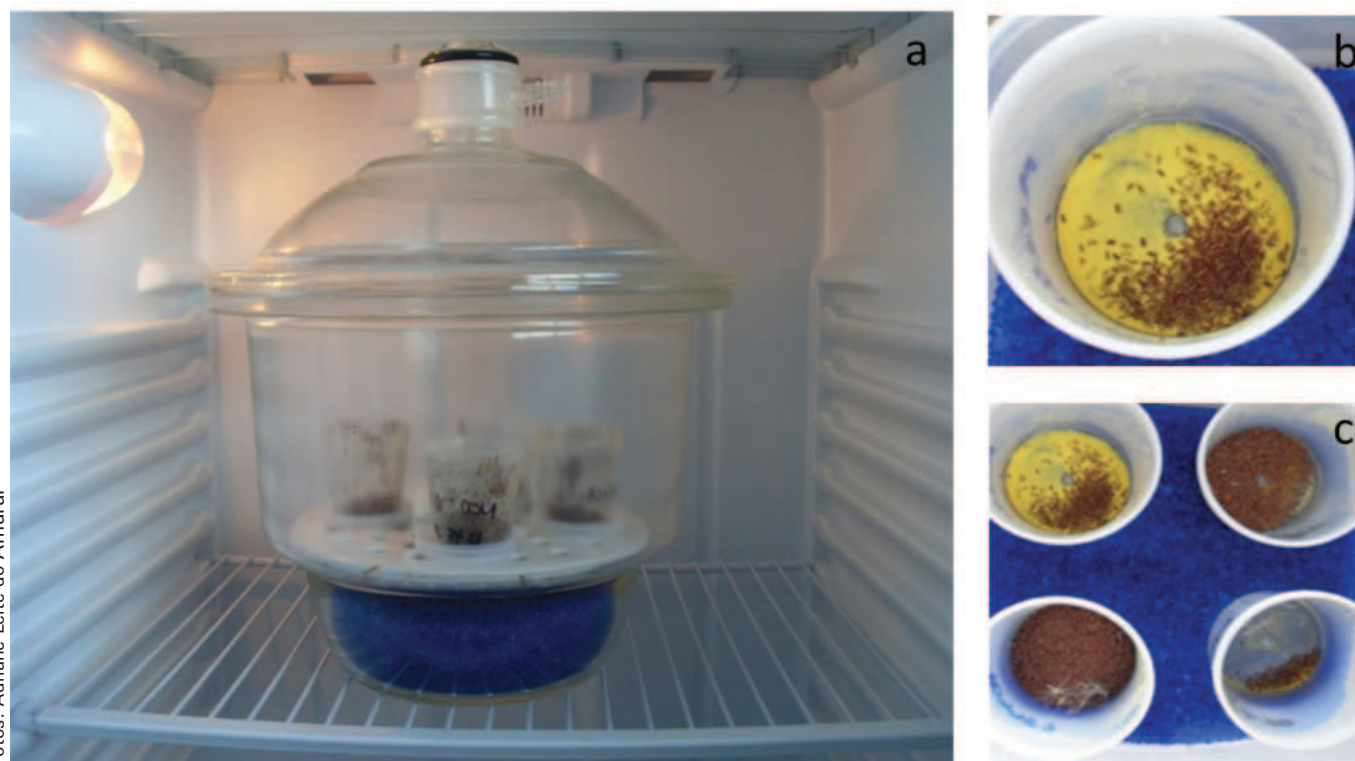


Figura 4. Desidratação de amostras de pólen de cana-de-açúcar em dessecadores de vidro com sílica gel azul em geladeira (4°C) (a). Em detalhe, amostras sobre sílica gel azul (b, c).

Acondicionamento do pólen

Imediatamente após a desidratação, os frascos tipo coletor contendo pólen desidratado devem ser fechados, lacrados com parafilme e considerados aptos à conservação em baixas temperaturas. Se a opção de conservação seguir a metodologia sugerida por Amaral et al. (2012; 2013a), os frascos devem ir imediatamente ao freezer, onde poderão ser armazenado por até 30 dias.

Cálculos usados na desidratação do pólen

Como os grãos de pólen de cana-de-açúcar são sensíveis à desidratação, é importante conhecer o teor de água constitucional do pólen, bem como quantificar o grau de dessecação provocado pela sílica, que seja favorável ao armazenamento. Da mesma forma, estes cálculos podem ser úteis para outras pesquisas que visem extrapolar a metodologia de desidratação para outras espécies e gêneros do Complexo *Saccharum* spp.

Teor de água do pólen

O teor de água das amostras de pólen pode ser determinado através de uma adaptação à metodologia de análise de umidade de sementes da Regra de Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

O presente trabalho recomenda estimar o teor de água para dois tipos de amostras de pólen (grãos-de-pólen e grãos-de-pólen mais anteras). Para as pesagens das amostras de pólen sugere-se a

confeção de taras de papel alumínio (5,0 cm x 5,0 cm). Na tara de papel alumínio, deve ser colocada uma porção de pólen ou de pólen mais anteras, equivalentes a extração de duas panículas (Figura 5).



Fotos: Adriane Leite do Amaral

Figura 5. Amostras preparadas e embaladas (a) e equipamentos (b) utilizados para a determinação do teor de água do pólen de cana-de-açúcar.

Para aferição do peso úmido e imediatamente à extração do pólen, as amostras devem ser pesadas em balança de precisão com cinco casas decimais (0,00001 g). Na sequência e para a determinação do peso seco, as amostras devem ser colocadas em estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. Após secagem e imediatamente após a abertura da estufa, as amostras devem ser pesadas novamente. De posse dos três valores de pesagem, peso úmido, peso seco e peso da tara de papel alumínio pode-se aplicar a equação para cálculo do teor de água (%) do pólen:

$$U (\%) = ((Pu - Ps) \times 100) / (Pu - Pt)$$

U = teor de água da amostra de pólen (%)

Pu = peso úmido (g)

Ps = peso seco (g)

Pt = peso da tara (g)

Grau de desidratação com sílica

O presente trabalho recomenda desidratação através de exposição à sílica gel azul sob refrigeração (18°C) e por um período máximo de 60 minutos, tendo em vista a sensibilidade do pólen à dessecação.

Dois tipos de amostras, grão-de-pólen e grãos-de-pólen mais anteras podem ser expostas à sílica. Como os genótipos apresentaram variações no gradiente de maturação e no tamanho das panículas, a quantidade de pólen fornecida para as pesagens e respectivas determinações variam bastante. Entretanto, recomenda-se obter amostras com pesos de aproximadamente 500 mg e de 200 mg, para as anteras com pólen e só pólen, respectivamente.

De posse dos valores de pesagem, peso úmido (imediatamente à extração do pólen) e peso seco (após tempo de exposição à sílica) aplicou-se a equação para cálculo do grau de desidratação (%) com sílica:

$$D (\%) = ((Pu - Ps) \times 100) / Pu$$

Onde:

D = grau de desidratação da amostra de pólen (%)

Pu = peso úmido (g)

Ps = peso seco (g)

Considerações finais

A metodologia de desidratação com sílica gel azul tem poder de extração relativo de 50% da umidade do pólen de cana-de-açúcar. Com o uso desta metodologia, amostras de pólen e de pólen mais anteras estão sendo desidratadas até alcançarem teores de umidade de 8% e 22%, respectivamente. Os teores de umidade alcançados com a desidratação são considerados favoráveis à conservação e portanto de aplicação potencial em programas de melhoramento.

Agradecimentos

Aos funcionários da Ridesa-UFAL e ao Engenheiro Agrônomo da Embrapa Tabuleiros Costeiros Diógenes dos Anjos de Medeiros pelo auxílio e dedicação na execução da pesquisa.

Referências

- AKIHAMA, T.; OMURA, M.; KOZAKI, I. Further investigation of freezer-drying for deciduous fruit tree pollen. In: AKIHAMA, T.; NAKAJIMA, K. (Ed.). Long term preservation of favorable germplasm in arboreal crops. Fujimoto: Fruit tree research station, 1978. p. 1-7.
- AHLGREN, C. E.; AHLGREN, I. F. Viability and fertility of vacuum dried pollen of 5 needle species. **Forestry Science**, Maryland, US, v. 24, n.1, p.100-102, 1978.
- AMARAL, A. L.; SANTOS, J. M. dos; CAMARA, T. M. M.; BARBOSA, G. V. de S. **Metodologia de conservação de pólen de cana-de-açúcar**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Comunicado Técnico, 127).
- AMARAL, A. L. do; SANTOS, J. M. dos; CAMARA, T. M. M.; DUARTE FILHO, L. S. C.; BARBOSA, G. V. de S. **Polen storage methodology in sugarcane**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2013a. 11 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Comunicado Técnico, 129).
- AMARAL, A. L. do; SANTOS, J. M. dos; CAMARA, T. M. M.; DUARTE FILHO, L. S. C.; BARBOSA, G. V. de S. Polen storage for asynchronic crosses in sugarcane. **Proceeding International Societ of Sugar Cane Technologists** Mauritius, v. 28, p. 779-786, 2013b.
- AUSTRALIA 2008 AUSTRALIA GOVERNMENT. The Biology of the *Saccharum* spp. In: AUSTRALIAN Government Office of the gene Technology regulatory. 2008. Disponível em: <www.ogtr.gov.au.> Acesso em: março de 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF, 1992. 365 p.
- CARDOSO, M. **Sílica Gel**. <http://www.infoescola.com/produtos-quimicos/silica-gel/> (consulta em 19 setembro 2015).
- FERREIRA, C. A.; VON PINHO, E. V. R.; ALVIM, P. O.; ANDRADE, V.; SILVA, T. T. A.; CARDOSO, D. L. Conservação e determinação da viabilidade de grãos de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, Minas Gerais, v. 26, n. 2, p.159-173, 2007.
- FRANÇA, L. V.; NASCIMENTO, W. M.; CARMONA, R.; FREITAS, R. A. Tolerância à dessecação de pólen de berinjela. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v.32, n.1, p. 53-59, 2010.
- HAIPENG, G.; HONG, H.; YUANBIA, O. Studies on the pollen moisture and drying methods of sugarcane and the relative grass. **Sugarcane and canesugar**, China: Guangxi Sugarcane Research Institute, 1993. v. 4, p. 9-12.
- HUGHES, H. G.; LEE, C. W. 1991. Low-temperature preservation of *Clianthus formosus* pollen. **HortScience**, Alexandria, US, 26:1411-1412.
- LIU, M.; CHEN, W.; YANG, L. Anther culture in sugarcane. I structure of anther & its pollen grain developmental stages. **Taiwan Sugar**, Taipei, TW, v.27, n. 3, p. 86-91,1980.
- MCGUIRE, D. C. Storage of tomato pollen. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, US, v. 60, p. 419-424, 1952.
- MOORE, P. H. Studies on sugarcane pollen II. Pollenstorage. **Phyton Revista Internacional De Botánica Experimental**, Argentina, v. 34, p. 71-80, 1976.
- VENKATRAMAN, R. S. T. S. Germination and preservation of sugarcane pollen. **Agricultural Journal of India**, Calcutta, v. 17, p. 127-132, 1922.
- WANG, Z. Y.; GE, Y.;SCOTT, M.; SPANGENBERG, G. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (fescue arundinacea) (poaceae) plants. **American Journal of Botany**, Ohio, US, v. 91, p. 523-530, 2004.

Comunicado Técnico, 167



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Endereço: Avenida Beira Mar, 3250,
CEP 49025-040, Aracaju - SE.
Fone: (79) 4009-1344
Fax: (79) 4009-1399
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF

1ª edição
On-line (2015)

Comitê de publicações

Presidente: Marcelo Ferreira Fernandes
Secretária-executiva: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues
Membros: Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Carlos Alberto da Silva, Élio César Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, João Gomes da Costa, Josué Francisco da Silva Junior, Julio Roberto Araujo de Amorim, Viviane Talamini e Walane Maria Pereira de Mello Ivo

Expediente

Supervisora editorial: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues
Tratamento das ilustrações: Joyce Feitoza Bastos
Editoração eletrônica: Joyce Feitoza Bastos